

F3



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/12, 15/31, 15/62, 15/70, 1/21, C07K 14/33, 14/74, C12Q 1/68, A61K 39/08, G01N 33/564</p>	A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/10335</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 20. März 1997 (20.03.97)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/01763</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 16. September 1996 (16.09.96)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>195 34 170.8 60/017,663</div> <div>14. September 1995 (14.09.95) 14. Mai 1996 (14.05.96)</div> <div>DE US</div> </div> </p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): UNIVERSITÄT TÜBINGEN [DE/DE]; Wilhelmstrasse 7, D-72074 Tübingen (DE).</p> <p>(71)(72) Anmelder und Erfinder: MELMS, Arthur [DE/DE]; Stohrerweg 12, D-72070 Tübingen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MALCHEREK, Georg [DE/DE]; Kohlplattenweg 8, D-72074 Tübingen (DE).</p> <p>(74) Anwalt: PERREY, Ralf; Müller-Boré & Partner, Grafinger Strasse 2, D-81671 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, GB, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: RECOMBINANT POLYPEPTIDE BASED ON THE PRIMARY SEQUENCE OF THE INVARIANT CHAIN WITH AT LEAST ONE PRIMARY SEQUENCE OF A SPECIFIC T-CELL EPITOPE OR A PROTEIN DERIVATIVE AND NUCLEIC ACIDS CODING FOR THIS RECOMBINANT POLYPEPTIDE</p> <p>(54) Bezeichnung: REKOMBINANTES POLYPEPTID BASIEREND AUF DER PRIMÄRSEQUENZ DER INVARIANTEN KETTE MIT MINDESTENS EINER PRIMÄRSEQUENZ VON EINEM SPEZIFISCHEN T-ZELLEPITOP ODER EINES PROTEINDERIVATS UND DIESES REKOMBINANTE POLYPEPTID KODIERENDE NUKLEINSÄUREN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns nucleic acids which contain at least one nucleic acid sequence coding for a recombinant polypeptide, the recombinant polypeptide containing at least partially the primary sequence of the invariant chain and at least one primary sequence of a specific T-cell epitope and being processed in antigen-presenting cells in order to bond the specific T-cell epitope to major histocompatibility complex-II molecules in the required manner.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die mindestens eine für ein rekombinantes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz enthalten, wobei das rekombinante Polypeptid mindestens teilweise die Primärsequenz der invarianten Kette und mindestens eine Primärsequenz von einem spezifischen T-Zellepitop enthält, und in Antigen-präsentierenden Zellen für eine Bindung des spezifischen T-Zellepitops an MHC II-Moleküle in gewünschter Weise prozessiert wird.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

REKOMBINANTES POLYPEPTID BASIEREND AUF DER PRIMÄRSEQUENZ DER INVARIANTEN KETTE MIT MINDESTENS EINER PRIMÄRSEQUENZ VON EINEM SPEZIFISCHEN T-ZELLE PITOP ODER EINES PROTEINDERIVATS UND DIESES REKOMBINANTE POLYPEPTID KODIERENDE NUKLEINSÄUREN

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die mindestens eine für ein rekombinantes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz enthalten, wobei das rekombinante Polypeptid mindestens teilweise die Primärsequenz der invarianten Kette und mindestens eine Primärsequenz von einem spezifischen T-Zellepitop oder einem Protein enthält und in Antigen-präsentierenden Zellen für eine Bindung des spezifischen T-Zellepitops an MHC Klasse II-Moleküle in gewünschter Weise prozessiert wird.

Gegen eine Vielzahl von Pathogenen stehen keine geeigneten Impfstoffe zur Verfügung. Bei den herkömmlichen Methoden der Vakzinierung werden abgetötete oder abgeschwächte Erreger als Impfstoff verwendet. Um unerwünschte Nebenwirkungen oder sogar einen Krankheitsausbruch zu verhindern, wurde in einzelnen Fällen versucht, Impfstoffe auf wenige, definierte Antigene zu beschränken, die mittels molekularbiologischer Methoden in nahezu reiner Form herstellbar sind und dennoch einen effizienten Impfschutz zu gewährleisten (z.B. Hepatitis B-Impfung mit einem rekombinanten HBsAg ["Hepatitis B surface Antigen"]).

Die bisher im Stand der Technik bekannten Impfstoffe neigen unter anderem aufgrund der Breite ihrer Immunogenität dazu, Nebenwirkungen hervorzurufen. Beispielsweise besteht ein einzelnes virales oder bakterielles Antigen in der Regel aus mehreren hundert Aminosäuren, wohingegen T-Zellen nur einen kleinen Ausschnitt (< 20 Aminosäuren) erkennen.

- 2 -

Um die Spezifität der T-Zellen auszunützen, wurden u.a. Impfstoffe auf Peptidbasis entwickelt. Peptide weisen jedoch mehrere Nachteile, wie eine kurze Halbwertszeit, eine nicht vorhersagbare und unspezifische Verteilung im Organismus, eine geringe Aufnahme in die Zelle, einen unklaren Prozessierungsweg, auf. Diese Faktoren führen zwangsläufig dazu, daß vom physiologischen Gesichtspunkt sehr hohe Konzentrationen an Peptiden eingesetzt werden müssen, um eine gewünschte Immunantwort zu erzielen. Dies schränkt selbstverständlich den Einsatz von Peptiden als spezifische Immuntherapeutika stark ein.

Antigene werden als Proteinfragmente an der Oberfläche von sogenannten "Antigen-präsentierenden Zellen" präsentiert und von T-Lymphozyten als Effektorzellen erkannt. Die MHC Klasse I- und Klasse II-Moleküle fungieren dabei als Peptidrezeptoren in den Antigen-präsentierenden Zellen. Zur Gewährleistung einer funktionellen Dichotomie werden die MHC-Moleküle in exakt regulierter Weise in bestimmten MHC-Beladungskompartimenten mit den prozessierten Antigenpeptiden beladen.

MHC-Moleküle sind Vertreter einer polymorphen Genfamilie, die chromosomal in einer besonderen Region, dem Haupt-Histokompatibilitätskomplex ("major histocompatibility complex", "MHC"), kodiert ist. Die MHC-Moleküle beim Menschen werden als HLA ("human leukocyte antigen")-Moleküle bezeichnet. MHC Klasse I-Moleküle werden direkt am Ort der Biosynthese mit de novo translatierten Virus- oder Tumorantigenen, aber auch körpereigenen zytosolischen Proteinfragmenten beladen. Im Gegensatz dazu werden MHC Klasse II-Moleküle (nachstehend kurz als "MHC II-Moleküle" bezeichnet) in zellulären Kompartimenten beladen, die in Verbindung mit dem extrazellulären Milieu stehen. Beim Menschen umfassen die MHC II-Moleküle die HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP Moleküle, die jeweils in verschiedenen genetisch kodierten Allelen auftreten. So können beispielsweise bakterielle Antigene aus dem extrazellulären Milieu aufgenommen werden und nach intrazellulärer Prozessierung in den Antigen-prä-

sentierenden Zellen an deren Zelloberfläche präsentiert werden.

Zur Gewährleistung einer effektiven Immunüberwachung, ist die Physiologie der MHC-Moleküle so ausgelegt, daß sie ein möglichst breites Spektrum antigenen Peptide präsentieren können. Folglich ist die Kopienzahl eines definierten antigenen Peptids an der Zelloberfläche Antigen-präsentierender Zellen sehr gering (Größenordnung 10^2 eines definierten antigenen Peptids bei einer Gesamtpopulation von etwa 10^5 Peptidrezeptoren). Dies bedeutet, daß an der Zelloberfläche der Antigen-präsentierenden Zellen ein sehr heterogenes Gemisch aus einer Vielzahl verschiedener, an MHC-Moleküle gebundener, antigenen Peptide ("Peptidliganden") exponiert ist.

Experimentelle Ansätze zur Herstellung definierter MHC/Peptid-Komplexe basieren bisher auf der Expression von rekombinanten MHC Molekülen z. B. im Baculovirus- oder *E. coli*-Expressionssystem. Diese MHC II-Moleküle haben eine leere Bindungsgrube und können *in vitro* mit geeigneten Peptiden beladen werden. Die Beladungseffizienz ist sehr unterschiedlich und lediglich für *in vitro*-Untersuchungen anwendbar.

Ein anderer Ansatz geht von rekombinanten MHC II-Molekülen aus, die, als Fusionsprotein (der β Kette) konstruiert, terminal einen gewünschten Liganden über einen flexiblen Linker besitzen. Dieser Ligandenabschnitt füllt spontan die Bindungsgrube, sodaß in Abhängigkeit vom verwendeten Zelltyp ein mehr oder weniger großer Anteil von MHC II-Molekülen diesen definierten Peptidliganden trägt. Dieser Ansatz ist limitiert auf die DNA-Transfektion von Wirtszellen, während eine direkte Applikation auf Proteinebene nicht möglich ist.

Somit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, die Antigenität von Proteinen zu verstärken und/oder die (intrinsische) Heterogenität der MHC II/antigenes Peptid-Komplexe von Antigen-präsentierenden Zellen zu verringern, wobei

u.a. die vorstehend aufgeführten Nachteile der im Stand der Technik beschriebenen Vakzinierungsverfahren beseitigt werden sollen. Insbesondere soll ein neues System für eine gerichtete und hochspezifische Stimulation des Immunsystems durch exakt definierbare antigene Peptide bereitgestellt werden, um beispielsweise die Vakzinierung von Säugern zu verbessern.

Diese Aufgabe wird durch die in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung gelöst. Insbesondere wird in einer ersten erfindungsgemäßen Ausführungsform eine Nukleinsäure bereitgestellt, die mindestens eine für ein rekombinantes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz enthält, wobei das rekombinante Polypeptid mindestens teilweise die Primärsequenz der invarianten Kette und mindestens eine Primärsequenz von einem spezifischen T-Zellepitop, das in den die CLIP-Sequenz umfassenden Bereich der invarianten Kette eingefügt ist, enthält, und wobei das rekombinante Polypeptid in Antigen-präsentierenden Zellen derart prozessiert wird, daß das spezifische T-Zellepitop erzeugt wird und an MHC II-Moleküle bindet.

In einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform wird eine Nukleinsäure bereitgestellt, die mindestens eine für ein rekombinantes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz enthält, wobei das rekombinante Polypeptid mindestens teilweise die Primärsequenz der invarianten Kette und mindestens eine Primärsequenz von einem spezifischen T-Zellepitop enthält, wobei mindestens eine Aminosäure des die CLIP-Sequenz umfassenden Bereichs der invarianten Kette deletiert ist und durch das T-Zellepitop ersetzt ist, und wobei das rekombinante Polypeptid in Antigen-präsentierenden Zellen derart prozessiert wird, daß das spezifische T-Zellepitop erzeugt wird und an MHC II-Moleküle bindet.

Die Begriffe "Nukleinsäure" und "Nukleinsäuresequenz" bedeuten natürliche oder halbsynthetische oder synthetische oder

modifizierte Nukleinsäuremoleküle aus Desoxyribonukleotiden und/oder Ribonukleotiden und/oder modifizierten Nukleotiden.

Der Begriff "rekombinantes Polypeptid" bzw. "Hybridprotein" bezeichnet ein mit molekularbiologischen Techniken hergestelltes Konstrukt, dem die natürliche DNA des original Genoms bzw. die natürliche DNA modifiziert mit einer fremden DNA-Sequenz zugrunde liegt und rekombiniert werden kann, z.B. mit Plasmiden, und in einem geeigneten Wirtssystem repliziert und expriert werden kann.

Der Begriff "T-Zellepitop" bedeutet eine antigene/immunogene Sequenz eines Proteins, das eine Aktivierung von T-Lymphozyten bewirkt, und umfaßt erfindungsgemäß die Primärsequenz des T-Zellepitops oder die Primärsequenz eines (antigenen) Polypeptids bzw. Proteins bzw. Antigens, das mindestens eine Primärsequenz eines T-Zellepitops enthält. T-Lymphozyten erkennen diesen Stimulus mit Hilfe eines T-Zellrezeptors normalerweise in der Form eines Peptids, das an MHC-Moleküle gebunden ist. T-Zellepitope können in bestimmten Fällen auch nur eine partielle Aktivierung bewirken, wobei eine Entkopplung verschiedener mit der T-Zellaktivierung assoziierter Vorgänge stattfinden kann. Dies kann die Entkopplung der proliferativen oder zytotoxischen gegenüber der Ausschüttung von einzelnen Mediatorstoffen (Lymphokinen) oder deren qualitative oder quantitative Zusammensetzung betreffen. Diese Art von Liganden weisen im Vergleich zu konventionellen T-Zellepitopen geringe Veränderungen in ihrer Primärsequenz auf (z.B. Substitution von einzelnen Aminosäuren) und werden in der Literatur als "veränderte Peptidliganden" ("altered peptide ligands", "APLs") bezeichnet. Unter experimentellen Bedingungen wird den APLs ein immuntherapeutisches Potential zugeschrieben.

Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung bezieht sich insbesondere auf die Modulation einer Subpopulation von T-Lymphozyten, die durch die Expression des Merkmals CD4 charakterisiert ist und die Antigene unter Vermittlung von sogenannten

MHC II-Molekülen erkennt. In der Terminologie werden diese T-Zellen als "MHC Klasse II-restringiert" bezeichnet. CD4-Lymphozyten umfassen die wichtigste regulatorische T-Zellpopulation, die in eine Vielzahl sogenannter T-zellabhängiger Immunreaktionen einbezogen sind. Dazu gehören neben physiologischen Aufgaben wie die Abwehr und Elimination von Pathogenen und entarteter körpereigener Zellen durch zellvermittelte Immunreaktionen und Wechselwirkungen zur Bildung hochaffiner Antikörper durch Immunglobuline produzierender B-Lymphozyten die Mitbeteiligung bei pathologischen Immunreaktionen wie der Gewebeabstoßung und organspezifischen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (RA), dem juvenilen Insulinpflichtigen Diabetes mellitus (IDDM), der multiplen Sklerose (MS) und einer Vielzahl anderer Erkrankungen des Menschen, bei denen eine Immunpathogenese nachgewiesen ist.

Das funktionelle Merkmal "Prozessierung des rekombinanten Polypeptids in Antigen-präsentierenden Zellen" bedeutet die intrazelluläre Degradation von antigenen Proteinen in Einheiten, die letztendlich assoziiert mit MHC-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert werden können. Die Prozessierung von MHC Klasse II restringierten Antigenen findet in distinkten zellulären Kompartimenten, die als endosomal-lysosomale Kompartimente oder "class II compartment" oder "class II loading compartment" bezeichnet werden, statt. Dort sind als minimale funktionelle Elemente MHC II-Moleküle, invariante Kette bzw. deren Abbauprodukte, HLA-DM und antigene Peptide konzentriert. Im allgemeinen werden Proteinasen wie Kathepsin D und E, die ihr Aktivitätsoptimum bei saurem pH haben, eine Funktion bei der Antigenprozessierung eingeräumt.

In den erfindungsgemäßen Ausführungsformen enthält das rekombinante Polypeptid mindestens teilweise die Primärsequenz der invarianten Kette. Der Begriff invariante Kette (Ii) bezeichnet ein konserviertes Polypeptid, das beispielsweise mit allen bisher untersuchten MHC-Klasse II-Allelen und -Isotypen aus Mensch und Maus assoziiert ist. Die invariante Kette kommt in

- 7 -

vier Isoformen vor, p33, p35, p41 und p43, deren Sequenz außerhalb des MHC-Locus kodiert wird. Ihre regulatorische Funktion bei der Antigenprozessierung übt sie durch ihre Assoziation im endoplasmatischen Retikulum mit MHC II-Molekülen unmittelbar nach ihrer Biosynthese aus. Als Chaperonin (Begleitmolekül) unterstützt sie die Assoziation der MHC α - und β -Untereinheiten, und im Komplex mit MHC II-Molekülen verhindert sie die vorzeitige Beladung der Bindungsgrube der MHC II-Moleküle mit Proteinfragmenten. Signalsequenzen der invarianten Kette führen diesen Komplex in das "class II loading compartment". Nach stufenweiser Degradation der invarianten Kette können die MHC II-Moleküle beladen werden, wobei als Intermediat Peptide, aus der invarianten Kette assoziiert mit MHC II-Molekülen ("CLIPs", "class II associated invariant chain peptides"), auftreten.

Die invariante Kette ist eines der ersten Proteine, die im endoplasmatischen Retikulum mit MHC II-Molekülen assoziieren und, was in diesem Zusammenhang besonders wichtig ist, so lange mit den MHC II-Molekülen assoziiert bleibt, bis ein sogenanntes "class II loading compartment" erreicht wird. Man nimmt an, daß in diesem distinkten zellulären Subkompartiment, in dem sich eine Reihe von Regulationsfaktoren wie z. B. die invariante Kette bzw. deren Abbauprodukte, HLA-DM, MHC II-Moleküle und Antigene konzentrieren, die invariante Kette durch proteolytische Aktivität gespalten wird, wobei ein Komplex aus MHC II-Molekülen mit Peptidderivaten der invarianten Kette (sog. "CLIPs") auftritt. Die Bindung der CLIPs an die MHC II-Moleküle wurde bereits eingehend untersucht, wobei in eigenen Untersuchungen festgestellt wurde, daß die CLIP-Sequenz sogenannte "Supermotive" enthält, die es den CLIPs ermöglichen, unabhängig vom Allel- oder Isotyp in der MHC II-Peptidbindungsgrube ähnlich wie konventionelle Liganden zu binden.

In den erfindungsgemäßen Ausführungsformen enthält das von der vorstehend definierten Nukleinsäuresequenz kodierte rekombinante Polypeptid mindestens teilweise Primärsequenzen der

natürlichen invarianten Kette, wobei in den die CLIP-Sequenz umfassenden Bereich der natürlichen invarianten Kette ein vorstehend definiertes T-Zellepitop eingefügt ist. Ferner kann der die CLIP-Sequenz umfassende Bereich der invarianten Kette wenigstens teilweise deletiert sein und durch ein gewünschtes T-Zellepitop ersetzt werden.

Der Ausdruck "CLIP-Sequenz umfassender Bereich" bedeutet einen Abschnitt in der natürlichen invarianten Kette, der die CLIP-Region von den AS-Positionen 97 bis 126 (bezogen auf die Isoform p35 mit Beginn beim ersten Startcodon) mit der Sequenz

L P K P P K P V S K M R M A T P L L M Q A L P M G A L P Q G

und gegebenenfalls die CLIP-Region flankierende N- und/oder C-terminale Bereiche, die bei Insertion von einem gewünschten T-Zellepitop oder bei Deletion und Substitution durch ein gewünschtes T-Zellepitop die Antigenprozessierung nicht nachteilig beeinflussen, umfaßt. Vorzugsweise werden geeignete T-Zellepitope in die CLIP-Region von AS-Positionen 97-126, mehr bevorzugt 107-115, der natürlichen invarianten Kette inseriert bzw. mindestens eine Aminosäure dieses Bereichs deletiert und durch das T-Zellepitop ersetzt. Selbstverständlich müssen auf Nukleinsäureebene die durch herkömmliche gentechnologische Methoden hergestellten Konstrukte, welche die erfindungsgemäße Nukleinsäure enthalten, für die gewünschte Expression der rekombinanten Polypeptide das richtige Leseraster aufweisen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der die vorstehend definierte, erfindungsgemäße Nukleinsäure zur Expression des rekombinanten Polypeptids in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen enthält. Der erfindungsgemäße Vektor kann vorzugsweise geeignete regulatorische Elemente, wie Promotoren, Enhancer, Terminationssequenzen, enthalten. Der erfindungsgemäße Vektor kann beispielsweise ein Expressionsvektor oder ein Vektor zur vorzugsweise

stabilen Integration der erfindungsgemäßen Nukleinsäure in das genetische Material einer Wirtszelle sein. Ein geeignetes Expressionssystem ist beispielsweise das Bakulovirus-System, das *E. coli*-Expressionssystem, bzw. Expressionsvektoren für Säugerzellen wie z. B. auf Vaccinia-, Adeno-, SV40- oder auf Retroviren basierende Vektoren.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, welche die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder den erfindungsgemäßen Vektor enthält. Geeignete Wirtszellen sind beispielsweise Prokaryonten, wie *E. coli*, oder eukaryotische Wirtszellen wie COS-, Hela-, CHO-Zellen, insbesondere Antigen-präsentierende Zellen von Säugern. Für eine ausreichende Expressionsrate ist die erfindungsgemäße Nukleinsäure entweder im genetischen Material der Wirtszelle stabil integriert oder der erfindungsgemäße Vektor enthält geeignete regulatorische Bereiche zur Replikation, Transkription und/oder Translation *in vivo* und/oder *in vitro*, d.h. auch im zellfreien System.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist das rekombinante Polypeptid selbst, das von der vorstehend definierten Nukleinsäuresequenz kodiert wird, wobei die Nukleinsäuresequenz entsprechend dem genetischen Code degeneriert sein kann. Das erfindungsgemäße rekombinante Polypeptid kann durch post-translationalen Reaktionen *in vivo* oder durch im Stand der Technik bekannte chemische und/oder enzymatische Methoden *in vitro* modifiziert sein.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz bzw. Hybrid-DNA, der erfindungsgemäße Vektor sowie das erfindungsgemäße rekombinante Polypeptid können durch im Stand der Technik bekannte Verfahren hergestellt werden. Beispielsweise kann die Hybrid-DNA in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden (z. B. pQE31, Fa. Diagen, Hilden, Deutschland) und kompetente M15-Zellen als Wirtszellen können mittels CaCl_2 -Methode transformiert werden. Transformierte Zellen werden mittels ihrer Ampicillinresistenz selektioniert und als Einzelkolonien für die

- 10 -

Kultivierung im Flüssigmedium verwendet. Nach Induktion mit IPTG wird das rekombinante Protein erzeugt und nach 3 Stunden aus dem Zellysat mittels Metallaffinitätschromatographie aufgereinigt.

Ferner ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, welche die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder das rekombinante Polypeptid und gegebenenfalls mindestens einen pharmazeutisch verträglichen Träger ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure kann als universell einsetzbares Vehikel zur Verstärkung und Homogenisierung der Antigenpräsentation für insbesondere CD4 positive T-Zellen von Säugern, vorzugsweise von Menschen, dienen. T-Zellepitope jeglicher Herkunft können in das Beladungskompartiment für die MHC II-Moleküle durch das erfindungsgemäße rekombinante Polypeptid eingeschleust werden, wobei die T-Zellepitope aus dem rekombinanten Polypeptid über Prozessierungssignale proteolytisch prozessiert und über intrinsische Bindungseigenschaften auf MHC II-Molekülen präsentiert werden.

Die Homogenisierung der T-Zellepitope an der Oberfläche von Antigen-präsentierenden ("immunkompetenten") Zellen kann zur Untersuchung des autoreaktiven Potentials auf T-Zellebene verwendet werden. Bei einer derartigen diagnostischen Verwendung werden die T-Zellepitope als Sonden für eine mögliche Prädisposition für Autoimmunkrankheiten herangezogen. Bekannte T-Zellepitope können als Sonde für eine Prädisposition von z. B. Rheumatischer Arthritis, Multipler Sklerose, Insulin-abhängiger Diabetis mellitus, Myasthenia gravis verwendet werden. Somit ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein diagnostischer Kit zum Nachweis von Autoimmunkrankheiten, der mindestens die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder das erfindungsgemäße rekombinante Polypeptid enthält.

- 11 -

Ferner kann entweder das durch die erfindungsgemäße Nukleinsäure in Antigen-präsentierenden Zellen exprimierte rekombinante Polypeptid oder das erfindungsgemäße rekombinante Polypeptid selbst durch Aufnahme in die Antigen-präsentierende Zelle und anschließender spezifischer Prozessierung und Präsentation des (der) gewünschten T-Zellepitops (-epitope) für eine hochspezifische und selektive Vakzinierung verwendet werden. Eine derartige Vakzinierung, initiiert durch die erfindungsgemäße Nukleinsäure bzw. das erfindungsgemäße rekombinante Polypeptid, zeigt überraschenderweise folgende Vorteile:

- Durch die intrazelluläre Prozessierung des rekombinanten Polypeptids wird selektiv und hochspezifisch nur ein bestimmtes T-Zellepitop oder antigenes Fragment erzeugt.
- Die Prozessierungseffizienz eines im erfindungsgemäßen rekombinanten Polypeptid enthaltenen T-Zellepitops ist um mehrere Größenordnungen höher; d.h. eine Applikation mit einem maßgeschneiderten Antigen bzw. antigenen Peptid zeigt *in vivo* eine deutlich höhere Vakzinierungseffizienz bei deutlich verringerten molaren Vakzindosen.
- Die Vakzinierung mit einem Hybrid bestehend aus Teilen der invarianten Kette und einem bekannten, T-Zellepitope enthaltenden Antigen ist möglich, ohne daß T-Zellepitope exakt definiert sein müssen. Dieser Ansatz sollte bei der Bekämpfung intrazellulärer Pathogene (Viren, Parasiten, Mycobakterien) und einer Verstärkung der T-Zellantwort gegen Tumorantigene nützlich sein.
- Die Möglichkeit der Applikation von definierten T-Zellepitopen erlaubt ein fokussiertes und spezifisches Eingreifen bei allergischen Reaktionen, mit dem Ziel allergenspezifische T-Zellen zu desensibilisieren. In analoger Weise sollte dieser Ansatz auch bei Autoimmunerkrankungen wie auch bei der Kontrolle von Transplantatsabstoßungen möglich sein.

Ferner kann das erfindungsgemäße rekombinante Polypeptid zur Modulation der Immunantwort durch Selbst-, Fremd- und Desig-

ner-Peptide verwendet werden, wobei eine derartige Modulation aufgrund der vorstehend aufgeführten Vorteile des erfindungsgemäßen rekombinanten Polypeptids effizienter durchgeführt werden kann. Ferner kann durch Integration von sogenannten "altered peptide ligands (APL)" als T-Zellepitope im erfindungsgemäßen rekombinanten Polypeptid der Aktivierungszustand von T-Zellen beeinflusst werden.

Figur 1 zeigt die Titrationskurven verschiedener Darreichungsformen des Tetanustoxins (TT) bzw. der antigenen Peptide/Polypeptide von *Clostridium tetani*, wobei die Einbaurate von ³H-Thymidin als Maß der T-Zellproliferation in Abhängigkeit der Antigenkonzentration dargestellt ist. Die basale Proliferation ohne Zugabe eines Antigens liegt bei 1.500 cpm. Das antigene TT-Peptid TT(1061-1075) enthält das T-Zellepitop. Das Ii-TT-Hybrid enthält die Kernsequenz TT(1064-1072) anstelle der CLIP-Kernsequenz Ii₁₀₇-Ii₁₁₅ der invarianten Kette. TTC ist ein rekombinantes Polypeptid des C-Fragments des TT, das natürlicherweise das antigene TT-Peptid TT(1061-1075) enthält. Das CLIP-TT-Hybrid ist ein Hybrid eines CLIP-Peptids, bei dem die CLIP-Kernsequenz gegen das Kernepitop TT(1064-1072) ausgetauscht wurde. Beim Ii-P-TT-Hybrid ist der Anteil der CLIP-Sequenz am N-Terminus verkürzt.

Figur 2 ist eine Coomassie Blau-Färbung eines SDS-Polyacrylamidgels mit Darstellung eines rekombinanten Ii-TT-Hybridproteins nach Aufreinigung über eine Metallo-Affinitätschromatographie.

Spur 2 zeigt das rekombinante Ii-TT-Hybridprotein als Einzelbande bei einem Molekulargewicht von etwa 22 Kilodalton (K). Molekulargewichts-Marker mit 20 K und 30 K sind in Spur 1 gezeigt.

Durch das nachfolgende Beispiel wird die vorliegende Erfindung näher erläutert.

Beispiel

Ein gut charakterisiertes T-Zellepitop aus dem Tetanustoxin wird in die Sequenz der invarianten Kette integriert. Dieses Hybrid-Antigen verstärkt die MHC Klasse II restringierte T-Helferzell-Antwort im Vergleich zu dem natürlichen Antigen bzw. dem rekombinanten C-Fragment um mehrere Potenzen.

Das System, worin die hocheffiziente Prozessierung des Hybridproteins demonstriert wird, benützt als Antigen das Toxin aus *Clostridium tetani*, aus dem ein T-Zellepitop in die invariante Kette als Prozessierungseinheit integriert wird. Die Primärsequenz dieses Tetanustoxins ist bekannt (Eisel et al., EMBO J., 1986), ebenso eine Vielzahl daraus generierter antigener Determinanten für humane T-Zellen.

Das T-Zellepitop TT(1061-1075) dieses Tetanustoxins wurde kürzlich als dominantes T-Zellepitop für T-Zellen von DR17-positiven Spendern nachgewiesen (Malcherek et al., in Druck). Das Restriktionselement für die Erkennung von TT(1061-1075) ist das MHC Klasse II-Molekül HLA-DR17. Die spezifischen Kontaktstellen zum HLA-DR17 Molekül einerseits (sogenannte Anker) und zum T-Zellrezeptor andererseits (T-Zellrezeptor-Kontaktstellen) können mit Hilfe Alanin-substituierter Peptidanaloga dissoziiert werden und auf ein Kernepitop von neun Aminosäuren (I R E D N N I T L) festgelegt werden (Malcherek et al., in Druck). Die zusätzlichen Aminosäuren außerhalb dieser Kernsequenz des TT-Peptids stabilisieren in der Regel die Bindung zum MHC Molekül, ohne daß diese Aminosäureseitenketten in spezifischer Weise mit dem MHC Molekül interagieren (Malcherek et al., J. Immunol. 1994, 153: 1141).

Die Titrationskurven verschiedener Darreichungsformen des Tetanustoxins bzw. der antigenen Peptide/Polypeptide zeigen den antigenen Charakter des Ii-TT-Hybridproteins, das darüberhinaus eine dramatisch verstärkte Immunogenität im Vergleich zum nativen Antigen und dem rekombinanten C-Fragment des TT

aufweist (vgl. Fig. 1). Dieser Verstärkungseffekt wird umso bemerkenswerter in Anbetracht der Tatsache, daß das dominante T-Zellepitop TT(1061-1075) des Tetanustoxins bereits in seiner physiologischen Umgebung im nativen Toxin sehr effizient prozessiert und von spezifischen T-Zellen erkannt wird (Malcherek et al., in Druck). Verdeutlicht wird dieser Sachverhalt durch die geringen Antigenkonzentrationen im picomolaren Bereich, die notwendig sind, um T-Zellen *in vitro* zur halbmaximalen Proliferationsleistung zu stimulieren (vgl. Fig. 1). Die Spezifität der Stimulation des T-Zellklons kann mittels eines anderen rekombinanten Ii-Konstrukts demonstriert werden, das die T-Zellen nicht zur Proliferation anregt.

Zudem kann mittels zweier weiterer Hybridpeptide dargestellt werden, daß in der Tat die Kernsequenz für eine optimale Stimulation ausreichend ist (vgl. Fig. 1). Diese Hybridpeptide werden so konzipiert, daß die Kernsequenz aus dem Tetanustoxin von Aminosäuren aus den CLIP-Peptiden flankiert wird. Damit soll die Situation imitiert werden, die bei der Prozessierung des hybriden Antigens erwartet wird. Das kürzere Peptid KPVSK-TT(1064-1072)-QA ("Ii-P-TT-Hybrid") stimuliert ähnlich gut wie das originale T-Zellepitop TT(1061-1075). Das längere Peptid hingegen, das quasi ein CLIP-Hybrid ("CLIP-TT-Hybrid") darstellt, hat aber eindeutig ein stärkeres antigenes Potential als TT(1061-1075).

Diese Daten sind ein sicheres Indiz dafür, daß Sequenzen der CLIP-Region außerhalb der Kernsequenz von Ii(107-115) die Antigenität der Kernsequenz des T-Zellepitops verstärken können. Eine weitere Verstärkungswirkung der Antigenität des Hybridproteins im Vergleich zum nativen Protein bzw. zum rekombinanten C-Fragment liefern die auf der invarianten Kette liegenden Sequenzen für eine optimale Prozessierung der T-Zellepitope.

Diese Daten zeigen ferner, daß antigene Sequenzen anstelle von CLIP-Sequenzen in Ii-Hybridkonstrukten effektiv prozessiert

werden, und die MHC Klasse II restringierte T-Zellantwort auf einer molaren Basis dramatisch verstärken.

1. Konstruktion der Plasmid-DNA-Kassette pQE31/Ii-TT

Die cDNA der p35 Ii (pcDV₁, Strubin et al., 1986) wird mit 5'- und 3'-spezifischen Oligonukleotid-Primern so amplifiziert, daß nur die kodierende Sequenz mittels neu eingefügter EcoRI-Restriktionsschnittstellen in pBluescript KS⁺ (Fa. Stratagene, Heidelberg, Deutschland) subkloniert werden kann. Mittels Oligonukleotid-gerichteter, ortsspezifische Mutagenese, basierend auf Polymerase Kettenreaktion (PCR), wird eine NspV-Restriktionsschnittstelle generiert, und die weiter 3'-gelegene NcoI-Restriktionsschnittstelle zerstört. Diese Ii-Mutante, welche die original Proteinsequenz der Ii kodiert, wird durch NspV/NcoI-Spaltung um die CLIP-Kernsequenz von Ii₁₀₇-Ii₁₁₅ (die Nomenklatur ist auf den Translationsstart bei Methionin 1 der nativen Ii bezogen) deletiert. In diese Ii-Kassette werden die Oligonukleotide ligiert, die für die Kernsequenz des T-Zellepitops [TT(1064-1072)] aus dem Tetanustoxin kodieren. Das PstI/BamHI-Fragment wird anschließend in pQE31 (Fa. Diagen, Hilden, Deutschland), ein bakterieller Expressionsvektor, subkloniert, wobei die Plasmid-DNA-Kassette pQE31/Ii-TT erhalten wird.

2. Expression des rekombinanten Polypeptids Ii-TT

Die Expression des rekombinanten Ii-TT-Hybridproteins erfolgt im wesentlichen entsprechend den Anleitungen zum QIA-express-System (Fa. Diagen, Hilden, Deutschland). Kompetente *E. coli* M15-Zellen werden mit pQE31/Ii-TT transformiert und 100 ml Bakterienkultur bei OD₆₀₀ von 0,5 mit IPTG induziert. Nach 3h wird das Zellpellet in 20 ml 6M Guanidiniumhydrochlorid lysiert und der Überstand nach Ultrazentrifugation (21.500 UPM, TI45) chromatographisch über eine Ni-NTA-Metall-Affinitätssäule (Fa. Diagen, Hilden, Deutsch-

- 16 -

land) gereinigt. Das pH 4,5-Eluat wird mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert. Die Coomassie Blau-Färbung zeigt eine Einzelbande bei 22 KD ohne sichtbare bakterielle Kontaminanten. (Die Identität des Ii-TT-Proteinhybrids wurde durch ELISA mit den Ii-spezifischen monoklonalen Antikörpern M-B741 (Geschenk von Prof. Dr. Rieber, Institut für Immunologie, München) und SD₃253.74 (Geschenk von Dr. H. Kalbacher, Physiologisch-Chemisches Institut, Universität Tübingen) bestätigt.)

Patentansprüche

1. Nukleinsäure, enthaltend mindestens eine für ein rekombinantes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz, wobei das rekombinante Polypeptid mindestens teilweise die Primärsequenz der invarianten Kette und mindestens eine Primärsequenz von einem spezifischen T-Zellepitop, das in den die CLIP-Sequenz umfassenden Bereich der invarianten Kette eingefügt ist, enthält, und wobei das rekombinante Polypeptid in Antigen-präsentierenden Zellen derart prozessiert wird, daß das spezifische T-Zellepitop erzeugt wird und an MHC II-Moleküle bindet.
2. Nukleinsäure, enthaltend mindestens eine für ein rekombinantes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz, wobei das rekombinante Polypeptid mindestens teilweise die Primärsequenz der invarianten Kette und mindestens eine Primärsequenz von einem spezifischen T-Zellepitop enthält, wobei mindestens eine Aminosäure des die CLIP-Sequenz umfassenden Bereichs der invarianten Kette deletiert ist und durch das T-Zellepitop ersetzt ist, und wobei das rekombinante Polypeptid in Antigen-präsentierenden Zellen derart prozessiert wird, daß das spezifische T-Zellepitop erzeugt wird und an MHC II-Moleküle bindet.
3. Nukleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, wobei der die CLIP-Sequenz umfassende Bereich die AS-Positionen 97 bis 126 der invarianten Kette ist.
4. Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das T-Zellepitop von einem Selbstprotein, oder einem viralen, prokaryotischen oder eukaryotischen Antigen stammt.
5. Vektor, enthaltend die Nukleinsäure von einem der Ansprüche 1 bis 4, zur Expression des rekombinanten Polypeptids in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszellen.

6. Wirtszelle, enthaltend die Nukleinsäure von einem der Ansprüche 1 bis 4 oder den Vektor von Anspruch 5.
7. Wirtszelle nach Anspruch 6, worin das rekombinante Polypeptid exprimiert wird.
8. Rekombinantes Polypeptid, enthaltend mindestens teilweise die Primärsequenz der invarianten Kette und mindestens eine Primärsequenz von einem spezifischen T-Zellepitop, das in den die CLIP-Sequenz umfassenden Bereich der invarianten Kette eingefügt ist, wobei das rekombinante Polypeptid in Antigen-präsentierenden Zellen derart prozessiert wird, daß das spezifische T-Zellepitop erzeugt wird und an MHC II-Moleküle bindet.
9. Rekombinantes Polypeptid, enthaltend mindestens teilweise die Primärsequenz der invarianten Kette und mindestens eine Primärsequenz von einem spezifischen T-Zellepitop, wobei mindestens eine Aminosäure des die CLIP-Sequenz umfassenden Bereichs der invarianten Kette deletiert ist und durch das T-Zellepitop ersetzt ist, und wobei das rekombinante Polypeptid in Antigen-präsentierenden Zellen derart prozessiert wird, daß das spezifische T-Zellepitop erzeugt wird und an MHC II-Moleküle bindet.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend die Nukleinsäure von einem der Ansprüche 1 bis 4 oder das rekombinante Polypeptid von Anspruch 8 oder 9, und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
11. Diagnostischer Kit zum Nachweis von Autoimmunkrankheiten, enthaltend die Nukleinsäure von einem der Ansprüche 1 bis 4 oder das rekombinante Polypeptid von Anspruch 8 oder 9.

- 1/1 -

Fig. 1: Prozessierung eines rekombinanten Ii-TT-Hybridproteins

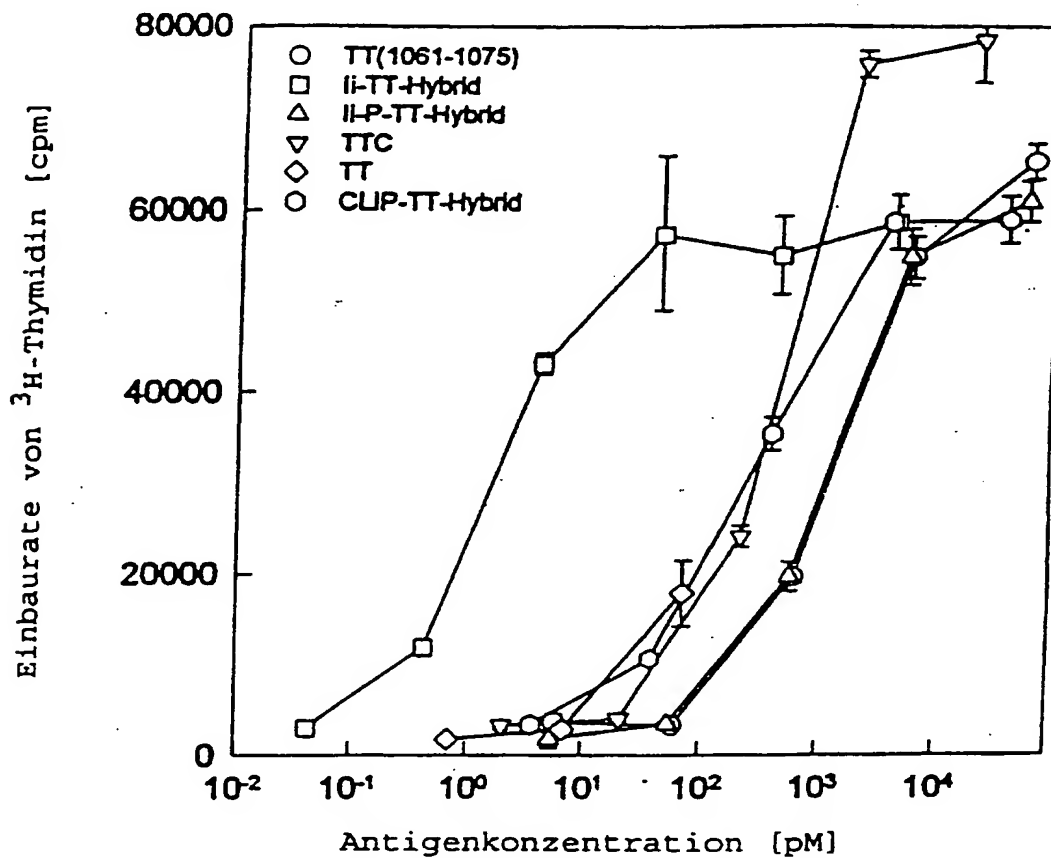


Fig. 2: SDS-PAGE des NI-NTA gereinigten Ii-TT-Hybridproteins

30K • —

20K • —

1 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 96/01763

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C12N15/31 C12N15/62 C12N15/70 C12N1/21
C07K14/33 C07K14/74 C12Q1/68 A61K39/08 G01N33/564

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K C12Q A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. (1995), 92(16), 7217-21 CODEN: PNASAG;ISSN: 0027-8424, 1995, XP002025345 SANDERSON, SARAH ET AL: "Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain -antigen fusion proteins" see the whole document --- -/--</p>	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 February 1997

Date of mailing of the international search report

26.02.97

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 96/01763

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. EXP. MED., vol. 181, no. 2, 1 February 1995, ROCKEFELLER UNIV. PRESS, US, pages 527-536, XP000644555 G. MALCHEREK ET AL.: "Supermotifs enable natural invariant chain-derived peptides to interact with many major histocompatibility complex-class II molecules" see the whole document ---	1-11
A	PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 90, October 1993, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;, pages 9703-9706, XP002025346 I.M. FREISEWINKEL ET AL.: "The segment of invariant chain that is critical for association with major histocompatibility complex class II molecules contain the sequence of a peptide eluted from class II polypeptides" see the whole document ---	1-11
A	NATURE, vol. 360, 3 December 1992, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK, pages 474-477, XP002025347 J.M. RIBERDY ET AL.: "HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides" see the whole document ---	1-11
A	SEMINARS IN ARTHRITIS AND RHEUMATISM, vol. 23, no. 3, December 1993, NEW YORK, NY, US, pages 193-197, XP002025348 A.A. ANSARI: "A possible role of the MHC-associated invariant chain in rheumatoid arthritis" see the whole document ---	1-11
A	AM. J. RESPIR. CELL MOL. BIOL., vol. 8, no. 5, May 1993, AM. LUNG ASSOCIATION, US, pages 461-467, XP002025349 C.V. HARDING: "Cellular and molecular aspects of antigen processing and the function of class II MHC molecules" see the whole document ---	1-11
A	WO 94 26773 A (ANTIGEN EXPRESS INC) 24 November 1994 see the whole document ---	1-11
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/DE 96/01763

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 94 04171 A (HARVARD COLLEGE) 3 March 1994 see page 9, line 27 - page 10, line 4 ---	1-11
A	J. IMMUNOL. (1989), 142(2), 394-402 CODEN: JOIMA3;ISSN: 0022-1767, 1989, XP002025350 DEMOTZ, STEPHANE ET AL: "Delineation of several DR-restricted tetanus toxin T cell epitopes" see the whole document ---	1-11
A	CELL (CAMBRIDGE, MASS.) (1986), 47(4), 619-25 CODEN: CELB5;ISSN: 0092-8674, 21 November 1986, XP000644711 STRUBIN, MICHEL ET AL: "Two forms of the Ia antigen-associated invariant chain result from alternative initiations at two in-phase AUGs" see the whole document ---	1-11
A	J. OF IMMUNOLOGY, vol. 153, 1994, WAVERLY PRESS, BALTIMORE, MD, US, pages 1141-1149, XP002025352 G. MALCHEREK ET AL.: "Analysis of allele-specific contact sites of natural HLA-DR17 ligands" cited in the application see the whole document -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 96/01763

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0-A-9426773	24-11-94	US-A- 5559028 CA-A- 2163196 EP-A- 0702692	24-09-96 24-11-94 27-03-96
-----	-----	-----	-----
W0-A-9404171	03-03-94	CA-A- 2142007 EP-A- 0671926 JP-T- 8504177	03-03-94 20-09-95 07-05-96
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Zeichen
PCT/DE 96/01763

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/12 C12N15/31 C12N15/62 C12N15/70 C12N1/21
C07K14/33 C07K14/74 C12Q1/68 A61K39/08 G01N33/564

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N C07K C12Q A61K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>PROC. NATL. ACAD. SCI. U. S. A. (1995), 92(16), 7217-21 CODEN: PNASA6;ISSN: 0027-8424, 1995, XP002025345 SANDERSON, SARAH ET AL: "Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain -antigen fusion proteins" siehe das ganze Dokument --- -/-</p>	1-9

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

* "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

* "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

* "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

* "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

* "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

* "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

* "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

* "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

* "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. Februar 1997

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

26.02.97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	J. EXP. MED., Bd. 181, Nr. 2, 1. Februar 1995, ROCKEFELLER UNIV. PRESS, US, Seiten 527-536, XP000644555 G. MALCHEREK ET AL.: "Supermotifs enable natural invariant chain-derived peptides to interact with many major histocompatibility complex-class II molecules" siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	PROC. NATL.ACAD SCI., Bd. 90, Oktober 1993, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;, Seiten 9703-9706, XP002025346 I.M. FREISEWINKEL ET AL.: "The segment of invariant chain that is critical for association with major histocompatibility complex class II molecules contain the sequence of a peptide eluted from class II polypeptides" siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	NATURE, Bd. 360, 3. Dezember 1992, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK, Seiten 474-477, XP002025347 J.M. RIBERDY ET AL.: "HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides" siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	SEMINARS IN ARTHRITIS AND RHEUMATISM, Bd. 23, Nr. 3, Dezember 1993, NEW YORK, NY, US, Seiten 193-197, XP002025348 A.A. ANSARI: "A possible role of the MHC-associated invariant chain in rheumatoid arthritis" siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	AM. J. RESPIR. CELL MOL. BIOL., Bd. 8, Nr. 5, Mai 1993, AM. LUNG ASSOCIATION, US, Seiten 461-467, XP002025349 C.V. HARDING: "Cellular and molecular aspects of antigen processing and the function of class II MHC molecules" siehe das ganze Dokument ---	1-11
A	WO 94 26773 A (ANTIGEN EXPRESS INC) 24. November 1994 siehe das ganze Dokument ---	1-11
-/--		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales
PCT/DE 96/01763

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 94 04171 A (HARVARD COLLEGE) 3.März 1994 siehe Seite 9, Zeile 27 - Seite 10, Zeile 4	1-11
A	--- J. IMMUNOL. (1989), 142(2), 394-402 CODEN: JOIMA3;ISSN: 0022-1767, 1989, XP002025350 DEMOTZ, STEPHANE ET AL: "Delineation of several DR-restricted tetanus toxin T cell epitopes" siehe das ganze Dokument	1-11
A	--- CELL (CAMBRIDGE, MASS.) (1986), 47(4), 619-25 CODEN: CELLB5;ISSN: 0092-8674, 21.November 1986, XP000644711 STRUBIN, MICHEL ET AL: "Two forms of the Ia antigen-associated invariant chain result from alternative initiations at two in-phase AUGs" siehe das ganze Dokument	1-11
A	--- J. OF IMMUNOLOGY, Bd. 153, 1994, WAVERLY PRESS, BALTIMORE, MD, US, Seiten 1141-1149, XP002025352 G. MALCHEREK ET AL.: "Analysis of allele-specific contact sites of natural HLA-DR17 ligands" in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zu selben Patentfamilie gehören

Internationales . izeichen

PCT/DE 96/01763

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9426773	24-11-94	US-A- 5559028	24-09-96
		CA-A- 2163196	24-11-94
		EP-A- 0702692	27-03-96

WO-A-9404171	03-03-94	CA-A- 2142007	03-03-94
		EP-A- 0671926	20-09-95
		JP-T- 8504177	07-05-96

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.